

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2000年11月30日 (30.11.2000)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 00/71581 A1**

(51) 国際特許分類: C07K 14/47, C12P 21/02,  
C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/50, 33/15, 33/563,  
A61K 38/16, 39/395 // C12N 15/12

LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町  
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03221

(22) 国際出願日: 2000年5月19日 (19.05.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/140229 1999年5月20日 (20.05.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 伊藤康明 (ITOH,  
Yasuaki) [JP/JP]; 〒300-0832 茨城県土浦市桜ヶ丘町36  
番地16 Ibaraki (JP). 茂木伸一 (MOGI, Shinichi) [JP/JP];  
〒302-0121 茨城県北相馬郡守谷町みずき野1丁目  
17番地16 Ibaraki (JP). 田中秀幸 (TANAKA, Hideyuki)  
[JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地  
9-1302号 Ibaraki (JP). 大久保尚一 (OHKUBO, Shoichi)  
[JP/JP]; 〒300-1234 茨城県牛久市中央1丁目4番地23  
Ibaraki (JP). 大儀和宏 (OGI, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒305-  
0045 茨城県つくば市梅園2丁目16番地1-206号 Ibaraki  
(JP).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE

(54) 発明の名称: 新規ポリペプチド

(57) Abstract: A novel secretory protein or its salt; a process for producing this protein; drugs containing this protein; an antibody against this protein; a method/kit for screening a compound or its salt which promotes or inhibits the activity of the above protein, and the like. The above protein is usable in remedies and preventives for various diseases such as cancer, immune diseases, lung function disorder, liver function disorder, infectious diseases and gastrointestinal disorder. The above antibody is usable in quantitating the above protein in test samples, etc. Further, the above protein is useful as a reagent for screening a compound which promotes or inhibits the activity of this protein.

(57) 要約:

本発明は、分泌性新規タンパク質またはその塩、該タンパク質の製造法、該タンパク質を含有してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法/スクリーニング用キットなどに関する。

本発明のタンパク質は、例えば、癌、免疫疾患、肺機能障害、肝臓機能障害、感染症または胃腸障害などの種々の疾病の治療・予防剤として使用することができる。また、本発明の抗体は、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。さらに、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングするための試薬として有用である。

WO 00/71581 A1



(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 新規ポリペプチド

## 5 技術分野

本発明は新規な分泌性ポリペプチド、分泌性ポリペプチドの新規用途などに関する。

## 背景技術

10 生体は、細胞間、または組織間で互いに情報伝達をすることにより、発生、分化、成長、修復、恒常性の維持などの統合の取れた調節を行っているが、多くの場合、細胞外に分泌されるタンパク性因子が情報伝達物質として重要な役割を果たしている。例えば、サイトカインと呼ばれる一連の分泌性因子（液性因子）は、物質的には分子量2万～5万程度のしばしば糖鎖修飾を受けたポリ  
15 ペプチドで、主として免疫系、造血系に作用するホルモン様分子である。これまで、単球系細胞から放出されるマクロファージ活性化因子や遊走阻止因子として見いだされた各種モノカインや、種々の細胞を活性化して抗ウイルス作用を発揮させるインターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、またT細胞から產生されリンパ球增殖分化因子と考えられてきた各種リンホカインと呼ばれるポリペプチド群も、  
20 その後相次いで多彩な生物活性が報告され、総称的にサイトカインの範疇に含まれて呼ばれることが多い。サイトカインの作用の特徴として、オートクラインかパラクラインとしての活性が優位であることが挙げられる。一方、内分泌組織から生産されるペプチドホルモンや増殖因子などの液性因子は、エンドクライン的な活性を示し、これら液性因子の多くについて疾病との関連性を探る  
25 研究や医薬としての可能性を追求する開発研究が盛んに行われている。

ところで、こうした生体にとって重要なタンパク性因子は、これまでその多くが固有の生物活性を指標にして発見されたり、既存の生理活性ポリペプチドとの構造上の類似性を手がかりにして発見されてきたものである。しかし、哺

乳動物などの高等生物で見られる生体の恒常性の巧妙な維持を考えた場合、こうした公知の生理活性ポリペプチドやペプチド以外にも多くの未知の因子が存在し、重要な機能を担っていることが十分予想される。近年、ヒトをはじめ各種生物の cDNA ライブラリーの大規模塩基配列決定やゲノム構造解析プロジェクトにより膨大な数の新規遺伝子候補が挙がってきており、コンピュータによる情報処理解析技術を駆使してそれらの遺伝子産物の機能を予測し、生物学、医学、獣医学、農学などに応用しようとする試みが行われつつある [トレンドイン バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 14 卷, 294 (1996 年)]。しかし一般にそうした配列情報は断片的で不正確なものが多く、これらの中から直接的に全く新しい有用な新規遺伝子を選択することは容易でないのが現状である。例えば、大規模塩基配列決定で得られた配列情報の中には部分的な読み間違いが多々あり、正しいオープンリーディングフレーム (ORF) やアミノ酸配列を正確に知るには、間違いのない塩基配列を情報源とし、かつ分泌性因子（液性因子）として期待できるかどうか、適性に判断する必要があった。本発明は、そのような観点から大規模 cDNA 配列解析と、その後の詳細な情報分析から新規な液性因子を見出したものである。

本発明は新規な液性因子を見出すことで、生物学、医学、薬学、獣医学などに利用可能な新規ポリペプチド、その部分ペプチド、またはそれらの塩、組換えベクター、形質転換体、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチド、部分ペプチドを含有する医薬、および該ポリペプチドなどに対する抗体などを提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために誠意研究を重ねた結果、大規模 cDNA 塩基配列データベースから、新規分泌性ポリペプチドをコードする cDNA を探索し、本目的に合致した新規分泌性ポリペプチドの構造を複数ついた。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる少なくとも一つ（好ましくは、一つ）のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドまたはその塩、  
5 (2) 上記(1)記載のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩の製造法、  
(3) 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩に対する抗体、  
(4) 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする  
10 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、  
(5) 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、  
15 (6) 上記(4)記載のスクリーニング方法または上記(5)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、  
(7) 上記(4)記載のスクリーニング方法または上記(5)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩  
20 の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、および  
(8) 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる医薬などに  
関する。

さらには、本発明は、

- (9) 配列番号：1ないし配列番号：15で表わされるアミノ酸配列から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：1ないし配列番号：15で表わされるアミノ酸配列から選ばれる一つのアミノ酸配列と約50%以上（好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは

約 95 % 以上) の相同性を有するアミノ酸配列である上記 (1) ) 記載のポリペプチド、

- (10) 配列番号 : 1 ないし配列番号 : 15 で表わされるアミノ酸配列から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号 : 1 ないし配列番号 : 15 から選ばれる一つのアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上(好ましくは、1 ~ 30 個程度) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号 : 1 ないし配列番号 : 15 から選ばれる一つのアミノ酸配列に 1 または 2 個以上(好ましくは、1 ~ 30 個程度) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号 : 1 ないし配列番号 : 15 から選ばれる一つのアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上(好ましくは、1 ~ 30 個程度) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列である上記 (1) 記載のポリペプチド、

(11) 上記 (1) 記載のポリペプチドをコードするDNA、および

- (12) 上記 (1) 記載のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターなどを提供する。

さらに本発明のポリペプチドは、分子量マーカー、組織マーカー、染色体マッピング、遺伝病の同定、プライマー、プローブの設計などの基礎研究にも利用できる。

## 20 図面の簡単な説明

図 1 は実施例 16 - 20 で行われた各クローンの動物細胞における分泌確認の結果を示すウエスタンプロット解析図である。6-well plate から回収した培養上清 1/16 well 相当を 10 - 25% SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体を用いて Western Blot 解析を行なった。

- 図中、レーン 1 は TGC-480 を、レーン 2 は TGC-711 を、レーン 3 は TGC-714 を、レーン 4 は TGC-715 を、レーン 5 は TGC-623 をそれぞれ発現した COS7 細胞の培養上清を電気泳動したこと示す。

### 発明の実施をするための最良の形態

本発明の配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称することがある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臓 $\beta$ 細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脑基底球、海馬、視床、視床下部、大脑皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、臍臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋などに由来するポリペプチドであってもよく、組換えポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

また、本発明のポリペプチドはシグナルペプチドを有しているので、ポリペプチドを効率よく細胞外に分泌させることができる。

配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前

記の配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドなどが好ましい。

- 5 実質的に同質の性質としては、例えば、分泌され液性因子として作用するところなどが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が定性的に同質であることを示す。したがって、分泌作用や溶解度などの性質が同等（例、約0.1～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの性質の程度、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なっていてもよい。
- 10

- 具体的には、配列番号：1の第22番目のアミノ酸ないし125番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：2の第24番目のアミノ酸ないし121番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：3の第20番目のアミノ酸ないし223番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：4の第22番目のアミノ酸ないし248番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：5の第20番目のアミノ酸ないし173番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：6の第21番目のアミノ酸ないし261番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：7の第31番目のアミノ酸ないし243番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：8の第19番目のアミノ酸ないし149番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：9の第21番目のアミノ酸ないし136番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：10の第23番目のアミノ酸ないし123番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：11の第21番目のアミノ酸ないし163番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：12の第19番目のアミノ酸ないし301番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：13の第27番目のアミノ酸ないし

し 69 番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：14 の第 24 番目のアミノ酸ないし 69 番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：15 の第 27 番目のアミノ酸ないし 197 番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。

5 また、本発明のポリペプチドとしてより具体的には、例えば、配列番号：1 ないし配列番号：15 から選ばれる一つのアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：1 ないし配列番号：15 から選ばれる一つのアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：1 ないし配列番号：15 から選ばれる一つのアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号：1 ないし配列番号：15 から選ばれる一つのアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端が N 末端（アミノ末端）、右端が C 末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C 末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、C 末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

ここでエステルにおける R としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくは n-ブチルなどの C<sub>1-6</sub> アルキル基、例えば、シク

ロベンチル、シクロヘキシリなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルと

5 して汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシリル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシリル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

10 さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイルなどのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパクなどの複合タンパクなども含まれる。

本発明のポリペプチドまたはその塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔴酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養す

ることによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のポリペプチドまたはその塩、またはそのアミド体もしくはその塩の合成には、通常市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドまたはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOEt、HOOEt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOEtエステルあるいはHOOEtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド

- 縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。
- 活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソポルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフ

20 イノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級 ( $C_{1-6}$ ) アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基など  
5 が用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、 $Cl_2\text{-Bzl}$ 、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-  
10 2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmoc などが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HOBt、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20°C～40°Cの温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、  
25 アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる 2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により

除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

- 5 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

ポリペプチドのアミド体を得る別 の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側10 にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。

ポリペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、20 ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のポリペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従つて製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の1～5に記載された方法が挙げられる。

1. M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)
  2. Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)
  - 5 3. 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)
  4. 矢島治明 および 柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)
  5. 矢島治明監修、統医薬品の開発、第 14 卷、ペプチド合成、広川書店
- また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。
- 15 本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、前記した細胞・組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。
  - 20 ライブライアリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コンベクション、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。
  - 25 本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：1 ないし配列番号：30 から選ばれる少なくとも一つの塩基配列を含有するDNA、または配列番号：1 ないし配列番号：30 から選ばれる少なくとも一つの塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性などを有

するポリペプチドをコードするDNAなどを有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよい。

より具体的には、配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列を含有するDNA、または配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性など）を有するポリペプチドをコードするDNAなどを有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNAなどがあげられ、さらに具体的には、配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列を含有するDNA、または配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質（例、分泌作用など）を有するポリペプチドをコードするDNAなどを有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNAなどがあげられる。

配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

さらに具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：16で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：17で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコー

ドするDNAとしては、配列番号：19で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：20で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：21で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：22で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：23で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：24で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：25で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：26で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：13で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：29で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：30で表される塩基配列を含有するDNAがあげられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリ

ンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。

- 5 本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーとそのポリペプチドが発現している組織や細胞由来の鑄型を用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものをそのポリペプチドが発現している組織や細胞由来のライブラリーに対するハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutant<sup>TM</sup>-G(宝酒造(株))、Mutant<sup>TM</sup>-K(宝酒造(株))などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

- 20 クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製

造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイ

シン耐性遺伝子（以下、 $\text{Neor}^r$ と略称する場合がある、G 4 1 8 耐性）等が挙げられる。特に、 $\text{dhfr}$ 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて $\text{dhfr}$ 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

5 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、 $\text{PhoA}$ ・シグナル配列、 $\text{OmpA}$ ・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、 $\text{MF}\alpha$ ・シグナル配列、 $\text{SUC2}$ ・シグナル配列など、宿  
10 主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、  
15 昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレオツク・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)]など  
20 が用いられる。  
25

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス(*Bacillus subtilis*) M1114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1

984)]などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N5 CYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞またはEstigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J. L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

15 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスA<sub>t</sub>T-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 11

1(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール. 263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

15 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、  
20 ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カゼミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせ

るために、例えば、 $3\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

5 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。

20 培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [Proceeding  
オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding

of the Society for the Biological Medicine) , 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。  
5

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、  
10 超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。  
15

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。  
20

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。  
25

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイや Western blotting などにより測定することができる。

本発明のポリペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のポリペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 15 [モノクローナル抗体の作製]

##### (a) モノクローナル抗体產生細胞の作製

本発明のポリペプチドは、温血動物に対して投与により抗体產生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体產生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体產生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、25 例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体產生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体產生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の

標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリ

- 5 コール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEG  
が用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：

- 10 1～2.0：1程度であり、PEG (好ましくはPEG 1000～PEG 6000) が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が  
15 使用できるが、例えば、ポリペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

- モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業

(株) ) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日本製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリ

5 ドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクロナール抗体の精製

モノクロナール抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、  
10 イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

[ポリクロナール抗体の作製]

15 本発明のポリクロナール抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(ポリペプチド抗原)自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクロナール抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドまたはそれらの塩に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、

チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

また、本発明のポリペプチドを用いて、Nat Biotechnol, 14, 845-851. (1996)、Nat Genet 15, 146-156. (1997)、PNAS, 97(2), 722-727. (2000)等に記載の方法に準じてヒト化抗体を作製することも可能である。

本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスDNAの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチ

センスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明のポリペプチドは、シグナルペプチドを有するため、細胞外に効率よく分泌され、液性因子として、シグナル伝達や自己防衛などのための重要な生物活性を有する。

以下に、本発明のポリペプチドまたはその塩（以下、本発明のポリペプチド等と略記する場合がある）、本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のポリペプチドまたはそれらの塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

(1) 本発明のポリペプチドは、組織特異的に発現しているため、組織マーカーとして使用することができる。すなわち組織の分化、病態、癌の転移などの検出のためのマーカーとして有用である。また、対応するレセプター、リガンド、結合タンパクなどの分取にも利用できる。さらに、自体公知のハイスクループットスクリーニングのためのパネルにして、生物活性を調べるのに利用できる。また、染色体マッピングを行い、遺伝病の研究にも利用できる。

(2) 本発明のポリペプチドが関与する各種疾病的治療・予防剤

本発明のポリペプチドなどは、生体内で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチドなどまたは本発明のDNAなどに異常があつたり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または高進している場合、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの種々の疾病が発症する。

したがって、本発明のポリペプチド等および本発明のDNAは、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの種々の疾病的治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のポリペプチドなどが減少あるいは欠損しているために、細胞における情報伝達が十分に、あるいは正常に発揮されない患

者がいる場合に、(イ) 本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチド等を発現させることによって、(ロ) 細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチド等を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ) 本発明のポリペプチド等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチド等の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子錠やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のポリペプチド等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のポリペプチド等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチド等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターク、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖または

サッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

- 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。
- 本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

- このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。
- 本発明のポリペプチド等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、免疫疾患の治療目的で本発明のポリペプチド等を経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該ポリペプチド等を約1mg～1000mg、好ましくは約10～500m

g、より好ましくは約10～200mg投与する。非経口的に投与する場合は、該ポリペプチド等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、免疫疾患の治療目的で本発明のポリペプチド等を注射剤の形で成人(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該ポリペプチド等を約1～15000mg程度、好ましくは約1～200mg程度、より好ましくは約10～100mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

#### (2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチド等は生体内で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチド等の機能を促進する化合物またはその塩は、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの治療・予防剤などの医薬として使用できる。

一方、本発明のポリペプチド等の機能を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチド等の產生過剰に起因する疾患の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

したがって、本発明のポリペプチド等は、本発明のポリペプチド等の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

20 (1) 本発明のポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合がある）、または本発明のポリペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。

25 本発明のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたはその塩を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、

合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチド等の機能を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが  
5 用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチド等を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性  
10 液溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、炎症性疾患治療の目的で本発明のポリペプチド等の機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重  
15 60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。

非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患など  
20 によっても異なるが、例えば、炎症性疾患や免疫疾患治療の目的で本発明のポリペプチド等の機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たり  
25 に換算した量を投与することができる。

一方、本発明のポリペプチド等の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～

20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、本発明のポリペプチド等の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

### （3）本発明のポリペプチドまたはその塩の定量

本発明のポリペプチド等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチド等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチド等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチド等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチド等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチド等の定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチド等の定量法を提供する。

また、本発明のポリペプチド等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のポリペプチド等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチド等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応し

た抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、

- 5 感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時にになってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定

感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチド等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチド等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチド等の

測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参考することができる。

- 例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques (Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques (Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques (Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参考することができる。
- 15 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチド等を感度良く定量することができる。

- さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチド等の濃度を定量することによって、（1）本発明のポリペプチド等の濃度の減少が検出された場合、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

- また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチド等を検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチド等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチド等の検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

#### （4）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまた

は温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下

- 5 や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）, 第5巻, 874~879頁（1989年）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユースエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）, 第86巻, 2766~2770頁（1989年））などにより実施することができる。

- 10 例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの疾病である可能性が高いと診断することができる。

#### （5）アンチセンスDNAを含有する医薬

- 15 本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のポリペプチド等または本発明のDNAの機能を抑制することができるので、例えば、本発明のポリペプチドなどの発現過多に起因する疾患の治療・予防剤として使用することができる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する各種疾病的治療・予防剤と同様にして実施することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスペクター、アデノウイルスペクター、アデノウイルス

アソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるために診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

#### (6) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のポリペプチド等の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、本発明のポリペプチドなどの発現過多に起因する疾患の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて增量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒

剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

- 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、  
10 懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of  
15 hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。  
20 上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記抗体が含有されて  
25 いることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

#### （7）DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチド等をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 5 (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、  
(2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、  
(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および  
(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

10 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、D E A E - デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公  
15 知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

20 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C 5 7 B L / 6 系統、D B A 2 系統など、交雑系として、B 6 C 3 F<sub>1</sub> 系統、B D F<sub>1</sub> 系統、B 6 D 2 F<sub>1</sub> 系統、B A L B / c 系統、I C R 系統など）またはラット（例えば、W i s t a r, S D など）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

5 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチド10 を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明15 のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス

(例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど) に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチニナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$  Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ(一般にTie2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(Na; K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原(H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部(VN P)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列(一般にターミネーターと呼ばれる)を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのス

プライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に

本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドが関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治疗方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

- 5 また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- 10 ①組織培養のための細胞源としての使用、  
②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、  
15 ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、  
④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および  
⑤本発明の変異ポリペプチドの単離精製およびその抗体作製などが考えられる。
- 20 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。
- 25 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのポリペプチド分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、

またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができる、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### 10 (8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 15 (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- 20 (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- 25 (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を

促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人为的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人为的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、poly A付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプロープとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDN

A以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活性させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知

- 5 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善した  
10 BDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いられる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。  
15

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

- また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。  
20

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を增幅、検出する方法が、その1例として挙げができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。  
25

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色5 体数が $2n = 40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-10 0000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37°Cで培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日15 毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシードィングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー-エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドの細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別

することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、

- 5 導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

- 本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその  
10 近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

- 20 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に

導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活性化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活性化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病（例、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物また

はその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、  
5 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿など  
が挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物  
であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理  
し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変  
10 化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注  
射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選  
択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の  
性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 15 例えば、膵臓機能障害に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニ  
ングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、  
糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重  
変化などを経時的に測定する。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合  
20 物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチド等の欠損や損傷などによ  
って引き起こされる疾患（例、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環  
器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病など）に対して治療・  
予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医  
薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合  
25 物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合  
物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例  
アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加

塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオニ酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔴酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 5 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、

- 10 ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、炎症性疾患の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.

- 15 0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、炎症性疾患の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(8 b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

- 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物

としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

- 5 試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) 、可溶性アルカリフェオスマターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

- 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非  
10 ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由來の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド (X-gal) のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、  
20 本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-gal を含む染色液で、室温または37°C付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を 1 mM EDTA/PBS 液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZ  
25 をコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸）や塩基（例、有機酸）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。

この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することができるので、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病など治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、炎症性疾患の治療目的で本発明の

DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、  
5 60kg当たりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。  
10  
15

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

20

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。  
25

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン

T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
5 mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
10 ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
15 Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
20 Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
25 Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン

T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
5 p G l u	: ピログルタミン酸

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

M e	: メチル基
E t	: エチル基
10 B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
T o s	: p-トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
15 B z l	: ベンジル
C l <sub>2</sub> B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
20 B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t-ブトキシカルボニル
D N P	: ジニトロフェニル
T r t	: トリチル
B u m	: t-ブトキシメチル
25 F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン

HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルポルネン-2,3-ジカルボキシミド

DCC : N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

5 本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-480 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-546 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：3]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-595 のアミノ酸配列を示す。

10 [配列番号：4]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-623 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：5]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-624 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：6]

15 本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-625 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：7]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-628 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：8]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-708 のアミノ酸配列を示す。

20 [配列番号：9]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-711 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：10]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-714 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：11]

25 本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-715 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：12]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-749 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：13]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-768 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：14]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-772 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：15]

5 本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-790 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：16]

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチ  
ド TGC-480 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：17]

10 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチ  
ド TGC-546 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：18]

配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチ  
ド TGC-595 をコードするDNAの塩基配列を示す。

15 [配列番号：19]

配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチ  
ド TGC-623 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：20]

配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチ  
ド TGC-624 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：21]

配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチ  
ド TGC-625 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：22]

25 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチ  
ド TGC-628 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：23]

配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチ

ド TGC-708 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：24]

配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-711 をコードするDNAの塩基配列を示す。

5 [配列番号：25]

配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-714 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：26]

配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-715 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：27]

配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-749 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：28]

15 配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-768 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：29]

配列番号：14で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-772 をコードするDNAの塩基配列を示す。

20 [配列番号：30]

配列番号：15で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-790 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：31]

実施例1に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

25 [配列番号：32]

実施例1に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：33]

実施例2に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：34]

実施例2に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：35]

実施例3に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：36]

実施例3に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：37]

実施例4に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：38]

10 実施例4に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：39]

実施例5に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：40]

実施例5に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

15 [配列番号：41]

実施例6に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：42]

実施例6に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：43]

20 実施例7に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：44]

実施例7に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：45]

実施例8に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

25 [配列番号：46]

実施例8に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：47]

実施例9に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：48]

実施例9に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：49]

実施例10に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：50]

実施例10に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：51]

実施例11に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：52]

10 実施例11に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：53]

実施例12に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：54]

実施例12に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

15 [配列番号：55]

実施例13に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：56]

実施例13に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：57]

20 実施例14に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：58]

実施例14に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：59]

実施例15に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

25 [配列番号：60]

実施例15に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：61]

実施例16に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：62]

実施例16に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：63]

実施例17に記載のプライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：64]

実施例17に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：65]

実施例18に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：66]

10 実施例18に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：67]

実施例19に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：68]

実施例19に記載のプライマーの塩基配列を示す。

15 [配列番号：69]

実施例20に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：70]

実施例20に記載のプライマーの塩基配列を示す。

20 以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

#### 実施例1 データベースからのTGC-480の選択と塩基配列の解析

25 スミスクラインピーチャム (S B) 社から供給されているESTデータベースの中から分泌のためのシグナル配列とプロセシング部位をコードすると思われるクローンを選択した。具体的には、各ESTのDNA配列をアミノ酸配列に翻訳し、Metの後に疎水性アミノ酸 (Leu, Ile, Val, Alaなど) のクラスタ

ーを有し、かつ同一フレーム内にプロセシング部位に保存されている配列 (Arg-Arg, Lys-Arg, Lys-Lys) を有するクローンを選択した。その結果、これらの条件を満たすESTクローンとしてHGS:558273を発見した。ただし、EST配列では通常、塩基配列の欠失、挿入、読み違いなどの可能性があると同時に、cDNAの部分配列であるため、本クローンをTGC-480としてSB社から取り寄せ、該プラスミドの挿入DNA断片の全塩基配列を蛍光DNAシークエンサー(ABI PRISM™ 377, Perkin Elmer)を用いて決定した。その結果、本クローンの挿入配列(cDNA)は配列番号:1で表される125アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号:16で表される378塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号:1で表されるアミノ酸配列の、N末端の21アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、脳、精巣、心臓などでも発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち配列番号:16に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー(例えば、ATGCCAAGTACCTGGCCAGATCA及びTCACGTATGGGGCATCTGCCCTTT)を作製し、上記の組織のcDNAライブラー(例えば、脳、精巣、心臓など)や上記の組織由来のmRNAを錆型にしたRT-PCRで取得できる。具体的には、プライマーを各々5pmol、100mMトリス・塩酸緩衝液(pH9.0)5μl、500mM塩化カリウム溶液5μl、25mM塩化マグネシウム溶液3μl、1.2.5mMデオキシリボヌクレオチド溶液4μl、cDNA溶液1μl、およびTakara Taq™ 0.5μlを含む混合液50μlを調製し、Takara PCR Thermal Cycler MP(宝酒造(株))を用いて最初に95℃で1分間置いた後、95℃で30秒、65℃で1分、72℃で2分を1サイクルとして35サイクル各反応を繰り返し、さらに72℃、10分間反応させるプログラムでPCR反応を行うことで、目的のPCR断片が得られる。

### 実施例 2 データベースからの TGC-546 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:447917 を選択した後、本クローンを TGC-546 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの

5 挿入配列 (c DNA) は配列番号：2 で表される 121 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：17 で表される 366 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：2 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 23 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、精巣上体で発現していることが判明した。

10 なお、該 c DNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：17 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー（例えば、ATGCACAGATCAGAGCCATTCTGA 及び TTACAGTAGTGGCAGTAACACTTGG など）を作製し、上記の組織の c DNA ライブライマー（例えば、精巣上体など）や上記の組織由来の mRNA を鑄型にした RT-PCR で取得できる。PCR の反応条件は、  
15 実施例 1 に記載の方法が用いられる。

### 実施例 3 データベースからの TGC-595 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:1006634 を選択した後、本クローンを TGC-595 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (c DNA) は配列番号：3 で表される 223 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：18 で表される 672 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：3 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 19 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、脊髄、T 細胞、網膜などで発現していることが判明した。

なお、該 c DNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：18 に記載の塩基配列から 5'

末端と 3' 末端に対応する P C R 用のプライマー（例えば、 ATGAAGTTCGTCCCCCTGCCCTGC 及び TCACCCCTCGGAAGAAGCTGATGAGA）を作製し、上記の組織の c D N A ライブライリー（例えば、脊髄、 T 細胞、網膜など）や上記の組織由来の m R N A を錆型にした R T - P C R で取得できる。 P C R の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。

#### 実施例 4 データベースからの T G C - 623 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:92551 を選択した後、本クローンを T G C - 623 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（c D N A ）は配列番号： 4 で表される 248 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号： 19 で表される 747 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号： 4 で表されるアミノ酸配列の、 N 末端の 21 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、小脳、副腎などで発現していることが判明した。

なお、該 c D N A 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号： 19 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する P C R 用のプライマー（例えば、 ATGGGACCTGTGCCGTTGGAAATAT 及び TCAAAGATCTTCTCGGTCAAGTTG ）を作製し、上記の組織の c D N A ライブライリー（例えば、小脳、副腎など）や上記の組織由来の m R N A を錆型にした R T - P C R で取得できる。 P C R の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。

#### 実施例 5 データベースからの T G C - 624 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:1731120 を選択した後、本クローンを T G C - 624 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（c D N A ）は配列番号： 5 で表される 173 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号： 20 で表される 522 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号： 5 で表されるアミノ

酸配列の、N末端の19アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、樹状細胞、T細胞などで発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：20に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGTTTGCCCCACTGAAACTCATCC及びTCATGAAAATATCCATTCTACCTTG）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、樹状細胞、T細胞など）や上記の組織由来のmRNAを錆型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

#### 実施例6 データベースからのTGC-625の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法でHGS:1014817を選択した後、本クローンをTGC-625として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：6で表される261アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：21で表される786塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：6で表されるアミノ酸配列の、N末端の20アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、血管内皮細胞、骨髄などで発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：21に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGAACTGCTCAAGTGACCATTG及びTCAGTTCTGGTTTCTTGCA）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、血管内皮細胞、骨髄など）や上記の組織由来のmRNAを錆型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

### 実施例 7 データベースからの TGC-628 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:1878022 を選択した後、本クローンを TGC-628 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (c DNA) は配列番号：7 で表される 243 アミノ酸残基のポリペ

5 プチドをコードする、配列番号：22 で表される 732 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：7 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 30 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、胸腺、胎盤などで発現していることが判明した。

なお、該 c DNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法  
10 で実施することができる。すなわち、配列番号：22 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー（例えば、  
ATGCGACCCAGGGCCCCGCCGCCT 及び TTATTTGGTAGTTCTTCAATAATG）を作製し、上記の組織の c DNA ライブライマー（例えば、胸腺、胎盤など）や上記の組織由來の mRNA を鋳型にした RT-PCR で取得できる。PCR の反応条件は、  
15 実施例 1 に記載の方法が用いられる。

### 実施例 8 データベースからの TGC-708 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:2346555 を選択した後、本クローンを TGC-708 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (c DNA) は配列番号：8 で表される 149 アミノ酸残基のポリペ  
20 プチドをコードする、配列番号：23 で表される 450 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：8 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 18 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、単球で発現していることが判明した。

なお、該 c DNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：23 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー（例えば、  
ATGAAGTTACAGTGTGTTCCCTTT 及び TCAGGAGGCCGATGGGGGCCAGCAC）を作製し、上

記の組織のcDNAライブラリー（例えば、単球など）や上記の組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

##### 5 実施例9 データベースからのTGC-711の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法でHGS:809616を選択した後、本クローンをTGC-711として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：9で表される136アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：24で表される411塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：9で表されるアミノ酸配列の、N末端の20アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、小脳、肺などで発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：24に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGGCCAGCCTGGGGCTGCTGCTCC及びTCATGAGGCTCCTGCAGAGGTCTGA）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、小脳、肺など）や上記の組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

20

##### 実施例10 データベースからのTGC-714の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法でHGS:1260352を選択した後、本クローンをTGC-714として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：10で表される123アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：25で表される372塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：10で表されるアミノ酸配列の、N末端の22アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、精巣上体で発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：25に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGAAACTCCTGCTGCTGGCTTTC及びTCATGAGCTATGGTGAACATTGGA）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、精巣上体など）や上記の組織由来のmRNAを鑄型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

#### 実施例11 データベースからのTGC-715の選択と塩基配列の解析

10 実施例1で記載した同様の方法でHGS:81772を選択した後、本クローンをTGC-715として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：11で表される163アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：26で表される492塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：11で表されるアミノ酸配列の、N末端の20アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、精巣上体で発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：26に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGGCGGCCCTGCTGGCTGCTT及びCTACTGTGACAGGAAGCCAGGCTC）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、精巣上体など）や上記の組織由来のmRNAを鑄型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

#### 25 実施例12 データベースからのTGC-749の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法でHGS:1379897を選択した後、本クローンをTGC-749として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：12で表される301アミノ酸残基のポリ

ペプチドをコードする、配列番号：27で表される906塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：12で表されるアミノ酸配列の、N末端の18アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、T細胞、胎盤、肝臓、大腸などで発現している

5 ことが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：27に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGGCCCGGCATGGGTTACCGCTGC及びTTACAGCTCCCCCTGGCGGCCGGCCT）を作製し、上

10 記の組織のcDNAライブラリー（例えば、T細胞、胎盤、肝臓、大腸など）や上記の組織由来のmRNAを錆型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

### 実施例13 データベースからのTGC-768の選択と塩基配列の解析

15 実施例1で記載した同様の方法でHGS:398232を選択した後、本クローンをTGC-768として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：13で表される69アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：28で表される210塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：13で表されるアミノ酸配列の、N末端の26アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、精巣で発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：28に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGTGCTGGCTGCGGGCATGGGCC及びTTATCTATTATCATATATTCTTA）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、精巣など）や上記の組織由来のmRNAを錆型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

#### 実施例 14 データベースからの TGC-772 の選択と塩基配列の解析

- 実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:2079036 を選択した後、本クローンを TGC-772 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの
- 5 挿入配列 (c DNA) は配列番号：14 で表される 69 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：29 で表される 210 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：14 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 23 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、膵臓、胎盤などで発現していることが判明した。
- 10 なお、該 c DNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：29 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー（例えば、ATGGGGTTCCCGGCCGCGCGCTGC 及び CTACGCCAGACCGTGGGCCTGCGG）を作製し、上記の組織の c DNA ライブライバー（例えば、膵臓、胎盤など）や上記の組織由
- 15 来の mRNA を鋳型にした RT-PCR で取得できる。PCR の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。

#### 実施例 15 データベースからの TGC-790 の選択と塩基配列の解析

- 実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:2450362 を選択した後、本クローンを TGC-790 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの
- 20 挿入配列 (c DNA) は配列番号：15 で表される 197 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：30 で表される 594 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：15 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 26 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、胎盤で発現していることが判明した。

なお、該 c DNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：30 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー（例えば、

ATGCGAGGTGCCAAATGCAACATGC 及び TCATAAACTTGTGTTGGGCTTTAGG ) を作製し、上記の組織の c DNA ライブライマー（例えば、胎盤など）や上記の組織由来の mRNA を鋳型にした RT - PCR で取得できる。PCR の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。

5

#### 実施例 16 TGC-480 産物の COS7 細胞での発現発現

TGC-480 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、TGC-480 産物をコードする ORF を含む DNA 断片を、動物細胞用発現ベクター pCAN618 に挿入することによって得た。

10 まず、実施例 1 で得られた TGC-480 タンパクをコードしている cDNA 断片を鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるように設計した合成 DNA [ 5' - TCGGAATTGCCATGCCAAGTACCTGGCCAGATC - 3' : (配列番号 : 61 ) ] と、TGC-480 タンパクの C 末端に 8 アミノ酸からなる FLAG 配列 ( Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ) とそれに続いて終止コドン 15 及び制限酵素 Xho I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [ 5' - ACGCTCGAGTTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCGTATGGGGCATCTGCCCTTTTC - 3' : (配列番号 : 62 ) ] を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を用い、94°C 1 分の後、98°C 10 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分を 25 回の後、72°C 10 分の伸長反応を行なって TGC-480 の ORF 20 を含む DNA 断片を得た。この DNA 断片を制限酵素 Eco RI 及び Xho I で切断し、pCAN618 の Eco RI / Xho I 部位に挿入してヒト TGC-480 タンパクの動物細胞での発現ベクター pCAN618 / TGC-480FLAG を得た。

COS7 細胞  $4 \times 10^5$  を、10% の FBS (ウシ胎児血清) を含む DMEM (培地; Gibco BRL ) 中、6-well plate で 24 時間培養した。この細胞に、発現ベクター pCAN618 25 / TGC480FLAG DNA を LipofectAMINE ( GibcoBRL ) を用いて導入し、さらに 18 時間培養した。次に培地を 0.05% CHAPS を含む Opti-MEM (培地; GibcoBRL ) に換えてさらに 24 時間培養し、培養上清を回収した。上清は遠心によって浮いている細胞を除いた後、限外濾過 ( Centricon-10 ; Amicon ) で 10 倍にま

で濃縮し、2-メルカプトエタノールを含む同量の SDS-Sample Buffer を加えて 10 - 25% SDS-PAGE ( TEFCO ) で電気泳動した。これを PVDF 膜 (Amersham) に移して Western Blot 解析を行なった。一次抗体として、抗 FLAG マウス IgG ( 10  $\mu$  g/ml ; Sigma ) を用い、二次抗体には HRP ( Horseraddish peroxidase ) 標識抗マウス IgG 抗体 ( 2000 倍希釈 ; Amersham ) を用い、発色は ECLplus Western Blot Detection System (Amersham) を用いて行なつた。その結果、TGC-480 タンパクは培養上清中に分泌されることが分った (図 1)。

#### 10 実施例 17 TGC-623 産物の COS7 細胞での分泌発現

TGC-623 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、TGC-623 産物をコードする ORF を含む DNA 断片を、動物細胞用発現ベクター pCAN618FLAG に挿入することによって得た。pCAN618FLAG はプラスミドベクター pCAN618 に由来し、Sal I 部位直後に存在する 8 アミノ酸の FLAG 配列 ( Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys )をコードする塩基配列と終止コドンに読み取り枠を合わせることで、該目的タンパクを FLAG 融合タンパクとして発現させることが可能である。

まず、実施例 4 で得られた TGC-623 タンパクをコードしている cDNA 断片を鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるように 20 設計した合成 DNA [ 5' - TAGACGAATTCCCACCATGGGACCTGTGCGGTGGAAATATTGC - 3' : (配列番号 : 67 ) ] と、TGC-623 タンパクの C 末端に制限酵素 Sal I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [ 5' - AGGCAAGTCGACAAGATCT- 25 TCTCGGTCAAGTTGGGTGGCTTCCTGTCTGGTCAT - 3' : (配列番号 : 68 ) ] を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Pyrobest DNA Polymerase ( Takara ) を用い、94°C 1 分の後、98°C 10 秒、57°C 30 秒、72°C 1 分を 25 回の後、72°C 10 分の伸長反応を行なって TGC-623 の ORF を含む DNA 断片を得た。この DNA 断片を制限酵素 Eco RI 及び Sal I で切断し、pCAN618FLAG の Eco RI/Sal I 部位に挿入してヒト TGC-623 タンパクの動物細胞での発現ベ

クター pCAN618/TGC-623FLAG を得た。この発現ベクターを、実施例 16 と同様の方法で COS7 細胞に導入し、培養上清を調製して Western Blot 解析を行なった。その結果、TGC-623 タンパクは培養上清中に分泌されることが分った（図 1）。

5

#### 実施例 18 TGC-711 産物の COS7 細胞での分泌発現

TGC-711 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、実施例 16 に示した TGC-480 産物の場合と同様の方法で得た。

まず、実施例 9 で得られた TGC-711 タンパクをコードしている cDNA 断片を  
10 鑄型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるように  
設計した合成 DNA [ 5' - TCGGAATTGCCATGGCCAGCCTGGGGCTGCTGCTC - 3' ] : (配  
列番号: 63 ) ] と、TGC-711 タンパクの C 末端に 8 アミノ酸からなる FLAG  
配列 ( Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp- Asp-Asp-Lys ) とそれに続いて終止コドン及び  
制限酵素 Xho I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [ 5' -  
15 ACGCTCGAGTTACTTGTACATCGTCGTCCTTGAGTCTGAGGCTCCTGCAGAGGTCTGAGA - 3' ] : (配  
列番号: 64 ) ] を用いて PCR を行なった。PCR 及びその後の処理は実施例 16  
と同様の条件で行ない、ヒト TGC-711 タンパクの動物細胞での発現ベクター  
pCAN618/TGC-711FLAG を得た。この発現ベクターを、実施例 16 と同様の方法  
で COS7 細胞に導入し、培養上清を調製して Western Blot 解析を行なった。  
20 その結果、TGC-711 タンパクは培養上清中に分泌されることが分った（図 1）。

#### 実施例 19 TGC-714 産物の COS7 細胞での分泌発現

TGC-714 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、実施例 16 に示した TGC-480 産物の場合と同様の方法で得た。

25 まず、実施例 10 で得られた TGC-714 タンパクをコードしている cDNA 断片  
を鑄型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるよう  
に設計した合成 DNA [ 5' - TCGGAATTACCATGAAACTCCTGCTGCTGGCTCTT - 3' ] :  
(配列番号: 65 ) ] と、TGC-714 タンパクの C 末端に 8 アミノ酸からなる

FLAG 配列 ( Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ) とそれに続いて終止コドン及び制限酵素 Xho I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [ 5' - ACGCTCGAGTTACTTGTACATCGTCGTCCTTGTAGTCTGAGCTATGGTGAACATTGGAAG - 3' : (配列番号 : 66 ) ] を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Pyrobest DNA

- 5 Polymerase (宝酒造) を用い、94°C 1 分の後、98°C 10 秒、55°C 30 秒、  
72°C 30 秒を 25 回の後、72°C 10 分の伸長反応を行なって TGC-714 の  
ORF を含む DNA 断片を得た。この DNA 断片を制限酵素 Eco RI 及び Xho I で  
切断し、pCAN618 の Eco RI / Xho I 部位に挿入してヒト TGC-714 タンパクの  
動物細胞での発現ベクター pCAN618 / TGC-714FLAG を得た。
- 10 この発現ベクターを、実施例 16 と同様の方法で COS7 細胞に導入し、培養上  
清を調製して Western Blot 解析を行なった。その結果、TGC-714 タンパクは  
培養上清中に分泌されることが分った (図 1) 。

#### 実施例 20 TGC-715 産物の COS7 細胞での分泌発現

- 15 TGC-715 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、実施例 17  
に示した TGC-623 産物の場合と同様の方法で得た。

まず、実施例 11 で得られた TGC-715 タンパクをコードしている cDNA 断片  
を鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるよう

に 設 計 し た 合 成 DNA [ 5' -

- 20 GTGTAGAATTCCCCACCATGGGCGGCCCTGCTGCTGGCTGCTTTCTGGCTT - 3' : (配列番号 :  
69 ) ] と、TGC-715 タンパクの C 末端に制限酵素 Sal I 認識部位がくるよ  
うに設計した合成 DNA [ 5' - CTGGGCGTCGACCTGTGACAGGAAGGCCAGGCTCCTGCTCCACT  
- 3' : (配列番号 : 70 ) ] を用いて PCR を行なった。PCR は実施例 16 と  
同様の条件で行ない、得られた DNA 断片は実施例 17 と同様の方法で  
25 pCAN618FLAG の Eco RI / Sal I 部位に挿入してヒト TGC-715 タンパクの動  
物細胞での発現ベクター pCAN618 / TGC-715FLAG を得た。この発現ベクターを、  
実施例 16 と同様の方法で COS7 細胞に導入し、培養上清を調製して Western  
Blot 解析を行なった。その結果、TGC-715 タンパクは培養上清中に分泌される

ことが分った（図1）。

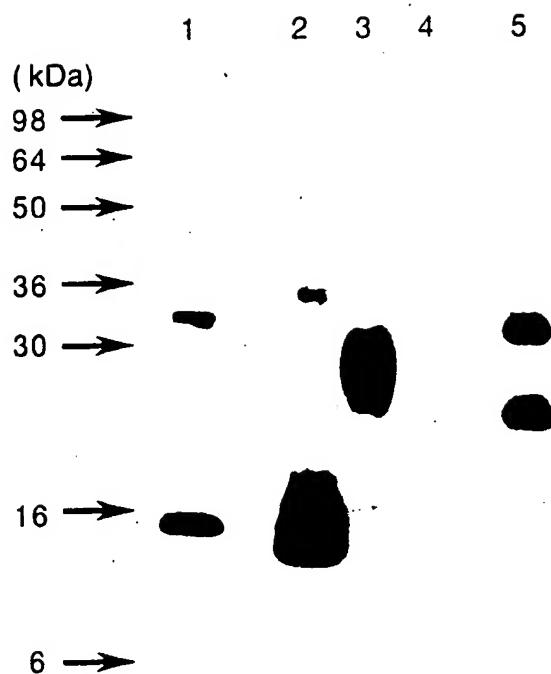
### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドは、例えば生物学、生理学、薬理学、医学などの基礎研究目的のための組織マーカー、癌マーカー、分子量マーカー、病態マーカー、本発明のポリペプチドに対する結合タンパクの検出などのために使用することができる。また、本発明のポリペプチドは1つ以上の生物活性を有していることが予想され、例えば、抗癌作用、抗炎症作用、造血作用、抗血液凝固作用、細胞遊走作用、細胞増殖刺激作用、細胞分化誘導作用、免疫調節作用、リガンド作用などを有している可能性が考えられることから、それらの作用に起因する病気の診断、治療、予防に使用することができる。さらに、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの検出、定量、中和などに使用することができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドまたはその塩。
2. 請求項1記載のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の製造法。
3. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩に対する抗体。
4. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
5. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
6. 請求項4記載のスクリーニング方法または請求項5記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。
7. 請求項4記載のスクリーニング方法または請求項5記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
8. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

図 1



## SEQUENCE LISTINGS

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Polypeptide

<130> 2609W00P

<150> JP 11-140229

<151> 1999-05-20

<160> 70

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Ala Lys Tyr Leu Ala Gln Ile Ile Val Met Gly Val Gln Val Val

5

10

15

Gly Arg Ala Phe Ala Arg Ala Leu Arg Gln Glu Phe Ala Ala Ser Arg

20

25

30

Ala Ala Ala Asp Ala Arg Gly Arg Ala Gly His Arg Ser Ala Ala Ala

35

40

45

Ser Asn Leu Ser Gly Leu Ser Leu Gln Glu Ala Gln Gln Ile Leu Asn

50

55

60

Val Ser Lys Leu Ser Pro Glu Glu Val Gln Lys Asn Tyr Glu His Leu

65

70

75

80

Phe Lys Val Asn Asp Lys Ser Val Gly Gly Ser Phe Tyr Leu Gln Ser

85

90

95

Lys Val Val Arg Ala Lys Glu Arg Leu Asp Glu Glu Leu Lys Ile Gln

100

105

110

Ala Gln Glu Asp Arg Glu Lys Gly Gln Met Pro His Thr

115 120 125

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met His Arg Ser Glu Pro Phe Leu Lys Met Ser Leu Leu Ile Leu Leu

5 10 15

Phe Leu Gly Leu Ala Glu Ala Cys Thr Pro Arg Glu Val Asn Leu Leu

20 25 30

Lys Gly Ile Ile Gly Leu Met Ser Arg Leu Ser Pro Asp Glu Ile Leu

35 40 45

Gly Leu Leu Ser Leu Gln Val Leu His Glu Glu Thr Ser Gly Cys Lys

50 55 60

Glu Glu Val Lys Pro Phe Ser Gly Thr Thr Pro Ser Arg Lys Pro Leu

65 70 75 80

Pro Lys Arg Lys Asn Thr Trp Asn Phe Leu Lys Cys Ala Tyr Met Val

85 90 95

Met Thr Tyr Leu Phe Val Ser Tyr Asn Lys Gly Asp Trp Phe Thr Phe

100 105 110

Ser Ser Gln Val Leu Leu Pro Leu Leu

115 120

<210> 3

<211> 223

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Lys Phe Val Pro Cys Leu Leu Leu Val Thr Leu Ser Cys Leu Gly  
5 10 15  
Thr Leu Gly Gln Ala Pro Arg Gln Lys Gln Gly Ser Thr Gly Glu Glu  
20 25 30  
Phe His Phe Gln Thr Gly Gly Arg Asp Ser Cys Thr Met Arg Pro Ser  
35 40 45  
Ser Leu Gly Gln Gly Ala Gly Glu Val Trp Leu Arg Val Asp Cys Arg  
50 55 60  
Asn Thr Asp Gln Thr Tyr Trp Cys Glu Tyr Arg Gly Gln Pro Ser Met  
65 70 75 80  
Cys Gln Ala Phe Ala Ala Asp Pro Lys Ser Tyr Trp Asn Gln Ala Leu  
85 90 95  
Gln Glu Leu Arg Arg Leu His His Ala Cys Gln Gly Ala Pro Val Leu  
100 105 110  
Arg Pro Ser Val Cys Arg Glu Ala Gly Pro Gln Ala His Met Gln Gln  
115 120 125  
Val Thr Ser Ser Leu Lys Gly Ser Pro Glu Pro Asn Gln Gln Pro Glu  
130 135 140  
Ala Gly Thr Pro Ser Leu Ser Pro Lys Ala Thr Val Lys Leu Thr Gly  
145 150 155 160  
Ala Thr Gln Leu Gly Lys Asp Ser Met Glu Glu Leu Gly Lys Ala Lys  
165 170 175  
Pro Thr Thr Gly Pro Thr Ala Lys Pro Thr Gln Pro Gly Pro Arg Pro  
180 185 190  
Gly Gly Asn Glu Glu Ala Lys Lys Ala Trp Glu His Cys Trp Lys  
195 200 205  
Pro Phe Gln Ala Leu Cys Ala Phe Leu Ile Ser Phe Phe Arg Gly  
210 215 220

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 248

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4

Met Gly Pro Val Arg Leu Gly Ile Leu Leu Phe Leu Phe Leu Ala Val

5

10

15

His Glu Ala Trp Ala Gly Met Leu Lys Glu Glu Asp Asp Asp Thr Glu

20

25

30

Arg Leu Pro Ser Lys Cys Glu Val Cys Lys Leu Leu Ser Thr Glu Leu

35

40

45

Gln Ala Glu Leu Ser Arg Thr Gly Arg Ser Arg Glu Val Leu Glu Leu

50

55

60

Gly Gln Val Leu Asp Thr Gly Lys Arg Lys Arg His Val Pro Tyr Ser

65

70

75

80

Val Ser Glu Thr Arg Leu Glu Glu Ala Leu Glu Asn Leu Cys Glu Arg

85

90

95

Ile Leu Asp Tyr Ser Val His Ala Glu Arg Lys Gly Ser Leu Arg Tyr

100

105

110

Ala Lys Gly Gln Ser Gln Thr Met Ala Thr Leu Lys Gly Leu Val Gln

115

120

125

Lys Gly Val Lys Val Asp Leu Gly Ile Pro Leu Glu Leu Trp Asp Glu

130

135

140

Pro Ser Val Glu Val Thr Tyr Leu Lys Lys Gln Cys Glu Thr Met Leu

145

150

155

160

Glu Glu Phe Glu Asp Ile Val Gly Asp Trp Tyr Phe His His Gln Glu

165

170

175

Gln Pro Leu Gln Asn Phe Leu Cys Glu Gly His Val Leu Pro Ala Ala

180 185 190

Glu Thr Ala Cys Leu Gln Glu Thr Trp Thr Gly Lys Glu Ile Thr Asp

195 200 205

Gly Glu Glu Lys Thr Glu Gly Glu Glu Gln Glu Glu Glu Glu Glu

210 215 220

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Asp Lys Met Thr Lys Thr Gly Ser His

225 230 235 240

Pro Lys Leu Asp Arg Glu Asp Leu

245

<210> 5

<211> 173

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Phe Cys Pro Leu Lys Leu Ile Leu Leu Pro Val Leu Leu Asp Tyr

5 10 15

Ser Leu Gly Leu Asn Asp Leu Asn Val Ser Pro Pro Glu Leu Thr Val

20 25 30

His Val Gly Asp Ser Ala Leu Met Gly Cys Val Phe Gln Ser Thr Glu

35 40 45

Asp Lys Cys Ile Phe Lys Ile Asp Trp Thr Leu Ser Pro Gly Glu His

50 55 60

Ala Lys Asp Glu Tyr Val Leu Tyr Tyr Ser Asn Leu Ser Val Pro

65 70 75 80

Ile Gly Arg Phe Gln Asn Arg Val His Leu Met Gly Asp Ile Leu Cys

85 90 95

Asn Asp Gly Ser Leu Leu Leu Gln Asp Val Gln Glu Ala Asp Gln Gly

100 105 110

Thr Tyr Ile Cys Glu Ile Arg Leu Lys Gly Glu Ser Gln Val Phe Lys

115 120 125

Lys Ala Val Val Leu His Val Leu Pro Glu Glu Pro Lys Glu Leu Met

130 135 140

Val His Val Gly Gly Leu Ile Gln Met Gly Cys Val Phe Gln Ser Thr

145 150 155 160

Glu Val Lys His Val Thr Lys Val Glu Trp Ile Phe Ser

165 170

<210> 6

<211> 261

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Met Glu Leu Leu Gln Val Thr Ile Leu Phe Leu Leu Pro Ser Ile Cys

5 10 15

Ser Ser Asn Ser Thr Gly Val Leu Glu Ala Ala Asn Asn Ser Leu Val

20 25 30

Val Thr Thr Thr Lys Pro Ser Ile Thr Thr Pro Asn Thr Glu Ser Leu

35 40 45

Gln Lys Asn Val Val Thr Pro Thr Thr Gly Thr Thr Pro Lys Gly Thr

50 55 60

Ile Thr Asn Glu Leu Leu Lys Met Ser Leu Met Ser Thr Ala Thr Phe

65 70 75 80

Leu Thr Ser Lys Asp Glu Gly Leu Lys Ala Thr Thr Asp Val Arg

85 90 95

Lys Asn Asp Ser Ile Ile Ser Asn Val Thr Val Thr Ser Val Thr Leu

100 105 110

Pro Asn Ala Val Ser Thr Leu Gln Ser Ser Lys Pro Lys Thr Glu Thr

115 120 125

Gln Ser Ser Ile Lys Thr Thr Glu Ile Pro Gly Ser Val Leu Gln Pro

130 135 140

Asp Ala Ser Pro Ser Lys Thr Gly Thr Leu Thr Ser Ile Pro Val Thr

145 150 155 160

Ile Pro Glu Asn Thr Ser Gln Ser Gln Val Ile Gly Thr Glu Gly Gly

165 170 175

Lys Asn Ala Ser Thr Ser Ala Thr Ser Arg Ser Tyr Ser Ser Ile Ile

180 185 190

Leu Pro Val Val Ile Ala Leu Ile Val Ile Thr Leu Ser Val Phe Val

195 200 205

Leu Val Gly Leu Tyr Arg Met Cys Trp Lys Ala Asp Pro Gly Thr Pro

210 215 220

Glu Asn Gly Asn Asp Gln Pro Gln Ser Asp Lys Glu Ser Val Lys Leu

225 230 235 240

Leu Thr Val Lys Thr Ile Ser His Glu Ser Gly Glu His Ser Ala Gln

245 250 255

Gly Lys Thr Lys Asn

260

<210> 7

<211> 243

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Arg Pro Gln Gly Pro Ala Ala Ser Pro Gln Arg Leu Arg Gly Leu  
5 10 15  
Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Pro Ala Pro Ser Ser Ala Ser Glu  
20 25 30  
Ile Pro Lys Gly Lys Gln Lys Ala Gln Leu Arg Gln Arg Glu Val Val  
35 40 45  
Asp Leu Tyr Asn Gly Met Cys Leu Gln Gly Pro Ala Gly Val Pro Gly  
50 55 60  
Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Asn Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly Ile  
65 70 75 80  
Pro Gly Arg Asp Gly Phe Lys Gly Glu Lys Gly Glu Cys Leu Arg Glu  
85 90 95  
Ser Phe Glu Glu Ser Trp Thr Pro Asn Tyr Lys Gln Cys Ser Trp Ser  
100 105 110  
Ser Leu Asn Tyr Gly Ile Asp Leu Gly Lys Ile Ala Glu Cys Thr Phe  
115 120 125  
Thr Lys Met Arg Ser Asn Ser Ala Leu Arg Val Leu Phe Ser Gly Ser  
130 135 140  
Leu Arg Leu Lys Cys Arg Asn Ala Cys Cys Gln Arg Trp Tyr Phe Thr  
145 150 155 160  
Phe Asn Gly Ala Glu Cys Ser Gly Pro Leu Pro Ile Glu Ala Ile Ile  
165 170 175  
Tyr Leu Asp Gln Gly Ser Pro Glu Met Asn Ser Thr Ile Asn Ile His  
180 185 190  
Arg Thr Ser Ser Val Glu Gly Leu Cys Glu Gly Ile Gly Ala Gly Leu  
195 200 205  
Val Asp Val Ala Ile Trp Val Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Pro Lys Gly  
210 215 220

Asp Ala Ser Thr Gly Trp Asn Ser Val Ser Arg Ile Ile Ile Glu Glu  
225 230 235 240  
Leu Pro Lys  
<210> 8  
<211> 149  
<212> PRT  
<213> Human  
<400> 8

Met Lys Leu Gln Cys Val Ser Leu Trp Leu Leu Gly Thr Ile Leu Ile  
5 10 15  
Leu Cys Ser Val Asp Asn His Gly Leu Arg Arg Cys Leu Ile Ser Thr  
20 25 30  
Asp Met His His Ile Glu Glu Ser Phe Gln Glu Ile Lys Arg Ala Ile  
35 40 45  
Gln Ala Lys Asp Thr Phe Pro Asn Val Thr Ile Leu Ser Thr Leu Glu  
50 55 60  
Thr Leu Gln Ile Ile Lys Pro Leu Asp Val Cys Cys Val Thr Lys Asn  
65 70 75 80  
Leu Leu Ala Phe Tyr Val Asp Arg Val Phe Lys Asp His Gln Glu Pro  
85 90 95  
Asn Pro Lys Ile Leu Arg Lys Ile Ile Ser Ile Cys Gln Leu Phe Pro  
100 105 110  
Leu His Ala Glu Asn Ser Ala Ala Met Cys Glu Ser Leu Gly Gln Asn  
115 120 125  
Ser Ser Ile Cys Ser Leu Ser Ala Gln Gly Glu Ala Arg Lys Cys Trp  
130 135 140  
Pro Pro Ser Ala Ser  
145

<210> 9

<211> 136

<212> PRT

<213> Human

<400> 9

Met Ala Ser Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr Ala Leu Pro

5

10

15

Pro Leu Trp Ser Ser Ser Leu Pro Gly Leu Asp Thr Ala Glu Ser Lys

20

25

30

Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ile Leu Ser Ala Leu Glu Arg Ala Thr Val

35

40

45

Phe Leu Glu Gln Arg Leu Pro Glu Ile Asn Leu Asp Gly Met Val Gly

50

55

60

Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Lys Ser Val Arg Glu Lys Trp Ala

65

70

75

80

Gln Glu Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Val Gly Met Leu Gly

85

90

95

Glu Lys Leu Glu Ala Ala Ile Gln Arg Ser Leu His Tyr Leu Lys Leu

100

105

110

Ser Asp Pro Lys Tyr Leu Arg Gly Arg Thr Ala Ala Ser Pro Ala Ala

115

120

125

Ser Gln Thr Ser Ala Gly Ala Ser

130

135

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Met Lys Leu Leu Leu Ala Leu Pro Met Leu Val Leu Leu Pro Gln

5

10

15

Val Ile Pro Ala Tyr Ser Gly Glu Lys Lys Cys Trp Asn Arg Ser Gly

20

25

30

His Cys Arg Lys Gln Cys Lys Asp Gly Glu Ala Val Lys Asp Thr Cys

35

40

45

Lys Asn Leu Arg Ala Cys Cys Ile Pro Ser Asn Glu Asp His Arg Arg

50

55

60

Val Pro Ala Thr Ser Pro Thr Pro Leu Ser Asp Ser Thr Pro Gly Ile

65

70

75

80

Ile Asp Asp Ile Leu Thr Val Arg Phe Thr Thr Asp Tyr Phe Glu Val

85

90

95

Ser Ser Lys Lys Asp Met Val Glu Glu Ser Glu Ala Gly Arg Gly Thr

100

105

110

Glu Thr Ser Leu Pro Asn Val His His Ser Ser

115

120

<210> 11

<211> 163

<212> PRT

<213> Human

<400> 11

Met Gly Gly Leu Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ala Leu Val Ser Val Pro

5

10

15

Arg Ala Gln Ala Val Trp Leu Gly Arg Leu Asp Pro Glu Gln Leu Leu

20

25

30

Gly Pro Trp Tyr Val Leu Ala Val Ala Ser Arg Glu Lys Gly Phe Ala

35

40

45

Met Glu Lys Asp Met Lys Asn Val Val Gly Val Val Val Thr Leu Thr

50 55 60

Pro Glu Asn Asn Leu Arg Thr Leu Ser Ser Gln His Gly Leu Gly Gly

65 70 75 80

Cys Asp Gln Ser Val Met Asp Leu Ile Lys Arg Asn Ser Gly Trp Val

85 90 95

Phe Glu Asn Pro Ser Ile Gly Val Leu Glu Leu Trp Val Leu Ala Thr

100 105 110

Asn Phe Arg Asp Tyr Ala Ile Ile Phe Thr Gln Leu Glu Phe Gly Asp

115 120 125

Glu Pro Phe Asn Thr Val Glu Leu Tyr Ser Leu Thr Glu Thr Ala Ser

130 135 140

Gln Glu Ala Met Gly Leu Phe Thr Lys Trp Ser Arg Ser Leu Gly Phe

145 150 155 160

Leu Ser Gln

<210> 12

<211> 301

<212> PRT

<213> Human

<400> 12

Met Ala Arg His Gly Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu Val

5 10 15

Gly Ala Trp Leu Lys Leu Gly Asn Gly Gln Ala Thr Ser Met Val Gln

20 25 30

Leu Gln Gly Arg Phe Leu Met Gly Thr Asn Ser Pro Asp Ser Arg

35 40 45

Asp Gly Glu Gly Pro Val Arg Glu Ala Thr Val Lys Pro Phe Ala Ile

50 55 60

Asp Ile Phe Pro Val Thr Asn Lys Asp Phe Arg Asp Phe Val Arg Glu  
65 70 75 80  
Lys Lys Tyr Arg Thr Glu Ala Glu Met Phe Gly Trp Ser Phe Val Phe  
85 90 95  
Glu Asp Phe Val Ser Asp Glu Leu Arg Asn Lys Ala Thr Gln Pro Met  
100 105 110  
Lys Ser Val Leu Trp Trp Leu Pro Val Glu Lys Ala Phe Trp Arg Gln  
115 120 125  
Pro Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ile Arg Glu Arg Leu Glu His Pro Val  
130 135 140  
Leu His Val Ser Trp Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Cys Ala Trp Arg Gly  
145 150 155 160  
Lys Arg Leu Pro Thr Glu Glu Glu Trp Glu Phe Ala Ala Arg Gly Gly  
165 170 175  
Leu Lys Gly Gln Val Tyr Pro Trp Gly Asn Trp Phe Gln Pro Asn Arg  
180 185 190  
Thr Asn Leu Trp Gln Gly Lys Phe Pro Lys Gly Asp Lys Ala Glu Asp  
195 200 205  
Gly Phe His Gly Val Ser Pro Val Asn Ala Phe Pro Ala Gln Asn Asn  
210 215 220  
Tyr Gly Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Asn Val Trp Glu Trp Thr Ala Ser  
225 230 235 240  
Pro Tyr Gln Ala Ala Glu Gln Asp Met Arg Val Leu Arg Gly Ala Ser  
245 250 255  
Trp Ile Asp Thr Ala Asp Gly Ser Ala Asn His Arg Ala Arg Val Thr  
260 265 270  
Thr Arg Met Gly Asn Thr Pro Asp Ser Ala Ser Asp Asn Leu Gly Phe  
275 280 285

Arg Cys Ala Ala Asp Ala Gly Arg Pro Pro Gly Glu Leu

290

295

300

<210> 13

<211> 69

<212> PRT

<213> Human

<400> 13

Met Cys Trp Leu Arg Ala Trp Gly Gln Ile Leu Leu Pro Val Phe Leu

5

10

15

Ser Leu Phe Leu Ile Gln Leu Leu Ile Ser Phe Ser Glu Asn Gly Phe

20

25

30

Ile His Ser Pro Arg Asn Asn Gln Lys Pro Arg Asp Gly Asn Glu Glu

35

40

45

Glu Cys Ala Val Lys Lys Ser Cys Gln Leu Cys Thr Glu Asp Lys Lys

50

55

60

Tyr Met Met Asn Arg

65

<210> 14

<211> 69

<212> PRT

<213> Human

<400> 14

Met Gly Phe Pro Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu

5

10

15

Leu Ala Pro Ala Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp

20

25

30

Arg Gly Arg Pro Arg Arg Thr Arg Thr Ser Ala Ala Ala Trp Pro Pro

35

40

45

Ser Ala Leu Ser Cys Ala Arg Thr Gly Ala Pro Ser Cys Pro Arg Arg

50

55

60

Pro Thr Val Ser Ala

65

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 197

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 15

Met Arg Gly Gly Lys Cys Asn Met Leu Ser Ser Leu Gly Cys Leu Leu

5

10

15

Leu Cys Gly Ser Ile Thr Leu Ala Leu Gly Asn Ala Gln Lys Leu Pro

20

25

30

Lys Gly Lys Arg Pro Asn Leu Lys Val His Ile Asn Thr Thr Ser Asp

35

40

45

Ser Ile Leu Leu Lys Phe Leu Arg Pro Ser Pro Asn Val Lys Leu Glu

50

55

60

Gly Leu Leu Leu Gly Tyr Gly Ser Asn Val Ser Pro Asn Gln Tyr Phe

65

70

75

80

Pro Leu Pro Ala Glu Gly Lys Phe Thr Glu Ala Ile Val Asp Ala Glu

85

90

95

Pro Lys Tyr Leu Ile Val Val Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ser Gln Lys

100

105

110

Lys Ser Cys Ser Gly Lys Thr Arg Ser Arg Lys Pro Leu Gln Leu Val

115

120

125

Val Gly Thr Leu Thr Pro Ser Ser Val Phe Leu Ser Trp Gly Phe Leu

130

135

140

Ile Asn Pro His His Asp Trp Thr Leu Pro Ser His Cys Pro Asn Asp

145

150

155

160

Arg Phe Tyr Thr Ile Arg Tyr Arg Glu Lys Asp Lys Glu Lys Lys Trp

165

170

175

Ile Phe Gln Ile Cys Pro Ala Thr Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Lys

180

185

190

Pro Asn Thr Ser Leu

195

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 378

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 16

ATGGCCAAGT ACCTGGCCCA GATCATTGTG ATGGGCGTGC AGGTGGTGGG CAGGGCCTTT	60
GCACGGGCCT TGCAGGCAGGA GTTTCAGCC AGCCGGGCCG CAGCTGATGC CCGAGGACGC	120
GCTGGACACC GGTCTGCAGC CGCTTCCAAC CTCTCCGGCC TCAGCCTCCA GGAGGCACAG	180
CAGATTCTCA ACGTGTCCAA GCTGAGCCCT GAGGAGGTCC AGAAGAACTA TGAACACTTA	240
TTTAAGGTGA ATGATAAACG CGTGGGTGGC TCCTTCTACC TGCAGTCAGG GGTGGTCCGC	300
GCAAAGGAGC GCCTGGATGA GGAACCTAAA ATCCAGGCC AGGAGGACAG AGAAAAAGGG	360
CAGATGCCCA ATACGTGA	378

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 17

ATGCACAGAT CAGAGCCATT TCTGAAATG TCGCTGCTGA TTCTGCTTT CCTGGGATTG	60
GCAGAAGCCT GTACTCCTCG TGAAGTCAC TTGCTGAAAG GGATCATAGG TCTCATGAGC	120
AGACTGTAC CGGATGAGAT CCTAGGCTTG CTGAGCCTCC AAGTACTGCA TGAAGAAACA	180

AGTGGCTGCA AGGAGGAAGT TAAACCCCTTC TCAGGCACCA CCCCATCCAG GAAACCACTC 240  
CCCAAGAGGA AGAACACGTG GAACTTCCTG AAATGCGCCT ACATGGTGAT GACCTACCTC 300  
TTCGTATCCT ACAACAAAGG GGACTGGTTC ACTTTTCCT CCCAAGTGT ACTGCCACTA 360  
CTGTAA

366

<210> 18

<211> 672

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

ATGAAGTTCG TCCCCTGCCT CCTGCTGGTG ACCTTGTCT GCCTGGGAC TTTGGGTAG 60  
CCCCCGAGGC AAAAGCAAGG AAGCACTGGG GAGGAATTCC ATTTCCAGAC TGGAGGGAGA 120  
GATTCTGCA CTATGCGTCC CAGCAGCTTG GGGCAAGGTG CTGGAGAAGT CTGGCTTCGC 180  
GTCGACTGCC GCAACACAGA CCAGACCTAC TGGTGTGAGT ACAGGGGGCA GCCCAGCATG 240  
TGCCAGGCTT TCGCTGCTGA CCCCAAATCT TACTGGAATC AAGCCCTGCA GGAGCTGAGG 300  
CGCCCTCACC ATGCGTGCCA GGGGGCCCCG GTGCTTAGGC CATCCGTGTG CAGGGAGGCT 360  
GGACCCCAGG CCCATATGCA GCAGGTGACT TCCAGCCTCA AGGGCAGCCC AGAGCCAAC 420  
CAGCAGCCTG AGGCTGGGAC GCCATCTCTG AGCCCCAAGG CCACAGTGAA ACTCACAGGA 480  
GCAACACAGC TGGGAAAGGA CTCGATGGAA GAGCTGGAA AAGCCAAACC CACCACCGGA 540  
CCCACAGCCA AACCTACCCA GCCTGGACCC AGGCCCCGGAG GGAATGAGGA AGCAAAGAAG 600  
AAGGCCTGGG AACATTGTTG GAAACCCCTTC CAGGCCCTGT GCGCCTTCT CATCAGCTC 660  
TTCCGAGGGT GA

672

<210> 19

<211> 747

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

ATGGGACCTG TGCAGGTTGGG AATATTGCTT TTCCCTTTT TGGCCGTGCA CGAGGCTTGG	60
GCTGGGATGT TGAAGGAGGA GGACGATGAC ACAGAACGCT TGCCCAGCAA ATGCGAAGTG	120
TGTAAGCTGC TGAGCACAGA GCTACAGGCG GAACTGAGTC GCACCCGGTCG ATCTCGAGAG	180
GTGCTGGAGC TGGGGCAGGT GCTGGATACA GGCAAGAGGA AGAGACACGT GCCTTACAGC	240
GTTCAGAGA CAAGGCTGGA AGAGGCCTTA GAGAATTAT GTGAGCGGAT CCTGGACTAT	300
AGTGTTCACG CTGAGCGCAA GGGCTCACTG AGATATGCCA AGGGTCAGAG TCAGACCATG	360
GCAACACTGA AAGGCCTAGT GCAGAAGGGG GTGAAGGTGG ATCTGGGAT CCCTCTGGAG	420
CTTGGGATG AGCCCAGCGT GGAGGTACA TACCTCAAGA AGCAGTGTGA GACCATGTTG	480
GAGGAGTTG AAGACATTGT GGGAGACTGG TACTTCCACC ATCAGGAGCA GCCCCTACAA	540
AATTTCTCT GTGAAGGTCA TGTGCTCCC GCTGCTGAAA CTGCATGTCT ACAGGAAACT	600
TGGACTGGAA AGGAGATCAC AGATGGGAA GAGAAAACAG AAGGGGAGGA AGAGCAGGAG	660
GAGGAGGAGG AAGAGGAGGA AGAGGAAGGG GGAGACAAGA TGACCAAGAC AGGAAGCCAC	720
CCCAAACTTG ACCGAGAAGA TCTTTGA	747

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 522

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 20

ATGTTTGCC CACTGAAACT CATCCTGCTG CCAGTGTAC TGGATTATTCTTGGGCCTG	60
AATGACTTGA ATGTTTCCCC GCCTGAGCTA ACAGTCCATG TGGGTGATTG AGCTCTGATG	120
GGATGTGTT TCCAGAGCAC AGAAGACAAA TGTATATTCA AGATAGACTG GACTCTGTCA	180
CCAGGAGAGC ACGCCAAGGA CGAATATGTG CTATACTATT ACTCCAATCT CAGTGTGCCT	240
ATTGGCGCT TCCAGAACCG CGTACACTTG ATGGGGACA TCTTATGCCA TGATGGCTCT	300
CTCCTGCTCC AAGATGTGCA AGAGGCTGAC CAGGGAACCT ATATCTGTGA AATCCGCCTC	360
AAAGGGGAGA GCCAGGTGTT CAAGAAGGCG GTGGTACTGC ATGTGCTTCC AGAGGAGCCC	420
AAAGAGCTCA TGGTCCATGT GGGTGGATTG ATTCAAGATGG GATGTGTTTT CCAGAGCACA	480
GAAGTGAAAC ACGTGACCAA GGTAGAATGG ATATTTCAT GA	522

&lt;210&gt; 21

<211> 786

<212> DNA

<213> Human

<400> 21

ATGGAACCTGC TTCAAGTGAC CATTCTTTT CTTCTGCCA GTATTCAG CAGTAACAGC 60  
ACAGGTGTT TAGAGGCAGC TAATAATTCA CTTGTTGTTA CTACAACAAA ACCATCTATA 120  
ACAACACCAA ACACAGAAC ATTACAGAAA AATGTTGTCA CACCAACAAC TGGAACAAC 180  
CCTAAAGGAA CAATCACCAA TGAATTACTT AAAATGTCTC TGATGTCAAC AGCTACTTT 240  
TTAACAAAGTA AAGATGAAGG ATTGAAAGCC ACAACCCTG ATGTCAGGAA GAATGACTCC 300  
ATCATTTCAA ACGTAACAGT AACAAAGTGT ACACCTCCAA ATGCTGTTTC AACATTACAA 360  
AGTTCCAAAC CCAAGACTGA AACTCAGAGT TCAATTAAAA CAACAGAAAT ACCAGGTAGT 420  
GTTCTACAAC CAGATGCATC ACCTCTAAA ACTGGTACAT TAACCTCAAT ACCAGTTACA 480  
ATTCCAGAAA ACACCTCACA GTCTCAAGTA ATAGGCACTG AGGGTGGAAA AAATGCAAGC 540  
ACTTCAGCAA CCAGCCGGTC TTATTCCAGT ATTATTTGC CGGTGGTTAT TGCTTGATT 600  
GTAATAACAC TTTCAGTATT TGTTCTGGTG GGTTGTACC GAATGTGCTG GAAGGCAGAT 660  
CCGGGCACAC CAGAAAATGG AAATGATCAA CCTCAGTCTG ATAAAGAGAG CGTGAAGCTT 720  
CTTACCGTTA AGACAATTTC TCATGAGTCT GGTGAGCACT CTGCACAAGG AAAAACCAAG 780  
AACTGA

786

<210> 22

<211> 732

<212> DNA

<213> Human

<400> 22

ATGCGACCCC AGGGCCCCGC CGCCTCCCCG CAGCGGCTCC GCGGCCTCCT GCTGCTCCTG 60  
CTGCTGCAGC TGCCCGCGCC GTCGAGCGCC TCTGAGATCC CCAAGGGAA GCAAAAGGCG 120  
CAGCTCCGGC AGAGGGAGGT GGTGGACCTG TATAATGGAA TGTGCTTACA AGGGCCAGCA 180  
GGAGTGCCTG GTCGAGACGG GAGCCCTGGG GCCAATGGCA TTCCGGGTAC ACCTGGGATC 240

CCAGGTCGGG ATGGATTCAA AGGAGAAAAG GGGGAATGTC TGAGGGAAAG CTTTGAGGAG 300  
TCCTGGACAC CCAACTACAA GCAGTGTCA TGGAGTTCAT TGAATTATGG CATAGATCTT 360  
GGGAAAATTG CGGAGTGTAC ATTACAAAG ATGC GTTCAA ATAGT GCTCT AAGAGTTTG 420  
TTCAGTGGCT CACTTCGGCT AAAATGCAGA AATGCATGCT GTCAGCGTTG GTATTCACA 480  
TTCAATGGAG CTGAATGTTG AGGACCTCTT CCCATTGAAG CTATAATTAA TTTGGACCAA 540  
GGAAGCCCTG AAATGAATTC AACAAATTAA ATTCAATCGCA CTTCTTCTGT GGAAGGACTT 600  
TGTGAAGGAA TTGGTGCTGG ATTAGTGGAT GTTGCTATCT GGGTTGGCAC TTGTTCAGAT 660  
TACCCAAAAG GAGATGCTTC TACTGGATGG AATTCA GTTCT CTCGCATCAT TATTGAAGAA 720  
CTACCAAAAT AA

732

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 23

ATGAAGTTAC AGTGTGTTTC CCTTTGGCTC CTGGGTACAA TACTGATATT GTGCTCAGTA 60  
GACAACCACG GTCTCAGGAG ATGTCTGATT TCCACAGACA TGCACCATAT AGAAGAGAGT 120  
TTCCAAGAAA TCAAAAGAGC CATCCAAGCT AAGGACACCT TCCCAATGT CACTATCCTG 180  
TCCACATTGG AGACTCTGCA GATCATTAAAG CCCTTAGATG TGTGCTGCGT GACCAAGAAC 240  
CTCCCTGGCGT TCTACGTGGA CAGGGTGTTC AAGGATCATC AGGAGCCAAA CCCCCAAAATC 300  
TTGAGAAAAA TCATCAGCAT TTGCCAACTC TTTCTCTAC ATGCAGAAAA CTCTGCGGCA 360  
ATGTGTGAGT CACTGGGTCA GAATTCCAGC ATCTGCTCCC TGTCTGCCA AGGAGAGGCC 420  
AGGAAGTGCT GGCCCCCATC GGCCTCCTGA 450

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 24

ATGCCAGCC TGGGCTGCT GCTCCTGCTC TTACTGACAG CACTGCCACC GCTGTGGTCC 60  
TCCTCACTGC CTGGGCTGGA CACTGCTGAA AGTAAAGCCA CCATTGCAGA CCTGATCCTG 120  
TCTGCGCTGG AGAGAGCCAC CGTCTTCCTA GAACAGAGGC TGCGCTGAAAT CAACCTGGAT 180  
GGCATGGTGG GGGTCCGAGT GCTGGAAGAG CAGCTAAAAA GTGTCCGGGA GAAGTGGGCC 240  
CAGGAGCCCC TGCTGCAGCC GCTGAGCCTG CGCGTGGGG A TGCTGGGG A GAAGCTGGAG 300  
GCTGCCATCC AGAGATCCCT CCACTACCTC AAGCTGAGTG ATCCAAGTA CCTAAGAGGA 360  
CGGACAGCAG CGAGCCCTGC GGCTCTCAG ACCTCTGCAG GAGCCTCATG A 411

<210> 25

<211> 372

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

ATGAAACTCC TGCTGCTGGC TCTTCCTATG CTTGTGCTCC TACCCCAAGT GATCCCAGCC 60  
TATA GTGGTG AAAAAAAATG CTGGAACAGA TCAGGGCACT GCAGGAAACA ATGCAAAGAT 120  
GGAGAACAG TGAAAGATA C ATGCAAAAT CTTCGAGCTT GCTGCATTCC ATCCAATGAA 180  
GACCACAGGC GAGTTCTGC GACATCTCCC ACACCCCTGA GTGACTCAAC ACCAGGAATT 240  
ATTGATGATA TTTAACAGT AAGGTTCACG ACAGACTACT TTGAAGTAAG CAGCAAGAAA 300  
GATATGGTTG AAGAGTCTGA GGCGGGAGG GGAAC TGAGA CCTCTCTTCC AAATGTTCAC 360  
CATAGCTCAT 60  
GA

372

<210> 26

<211> 492

<212> DNA

<213> Human

<400> 26

ATGGCGGCC TGCTGCTGGC TGCTTTCTG GCTTTGGTCT CGGTGCCAG GGCCAGGCC 60  
GTGTGGTTGG GAAGACTGGA CCCTGAGCAG CTTCTGGGC CCTGGTACGT GCTTGCAGTG 120  
GCCTCCGGG AAAAGGGCTT TGCCATGGAG AAGGACATGA AGAACGTCGT GGGGTGGTG 180

GTGACCCCTCA CTCCAGAAAA CAACCTGCGG ACGCTGTCT CTCAGCACGG GCTGGGAGGG 240  
TGTGACCAGA GTGTCATGGA CCTGATAAAG CGAAACTCCG GATGGGTGTT TGAGAATCCC 300  
TCAATAGGCG TGCTGGAGCT CTGGGTGCTG GCCACCAACT TCAGAGACTA TGCCATCATC 360  
TTCACTCAGC TGGAGTTCGG GGACGAGCCC TTCAACACCG TGGAGCTGTA CAGTCTGACG 420  
GAGACAGCCA GCCAGGAGGC CATGGGCTC TTCACCAAGT GGAGCAGGAG CCTGGGCTTC 480  
CTGTACAGT AG  
492  
<210> 27  
<211> 906  
<212> DNA  
<213> Human  
<400> 27  
ATGCCCGGC ATGGGTTACC GCTGCTGCC CTGCTGTCCG TCCTGGTCGG CGCGTGGCTC 60  
AAGCTAGGAA ATGGACAGGC TACTAGCATG GTCCAAGTGC AGGGTGGGAG ATTCTTGATG 120  
GGAACAAATT CTCCAGACAG CAGAGATGGT GAAGGGCCTG TGCGGGAGGC GACAGTGAAA 180  
CCCTTGCCA TCGACATATT TCCTGTCACC AACAAAGATT TCAGGGATTT TGTCAAGGGAG 240  
AAAAAGTATC GGACAGAACG TGAGATGTT GGATGGAGCT TTGTCTTGA GGACTTTGTC 300  
TCTGATGAGC TGAGAAACAA AGCCACCCAG CCAATGAAGT CTGTACTCTG GTGGCTTCCA 360  
GTGGAAAAGG CATTGGAG GCAGCCTGCA GGTCTGGCT CTGGCATCCG AGAGAGACTG 420  
GAGCACCCAG TGTTACACGT GAGCTGGAAT GACGCCGTG CCTACTGTGC TTGGCGGGGA 480  
AAACGACTGC CCACGGAGGA AGAGTGGAG TTTGCCGCC GAGGGGCTT GAAGGGTCAA 540  
GTTTACCCAT GGGGAACTG GTTCCAGCCA AACCGCACCA ACCTGTGGCA GGGAAAGTTC 600  
CCCAAGGGAG ACAAAAGCTGA GGATGGCTTC CATGGAGTCT CCCCAGTGAA TGCTTCCCC 660  
GCCCAAGAAC ACTACGGGCT CTATGACCTC CTGGGGAACG TGTGGGAGTG GACAGCATCA 720  
CCGTACCAGG CTGCTGAGCA GGACATGCGC GTCTCCGGG GGGCATCCTG GATCGACACA 780  
GCTGATGGCT CTGCCAATCA CGGGGCCGG GTCACCCACCA GGATGGCAA CACTCCAGAT 840  
TCAGCCTCAG ACAACCTCGG TTTCCGCTGT GCTGCAGACG CAGGCCGGCC GCCAGGGAG 900  
CTGTAA

906

<210> 28

<211> 210

<212> DNA

<213> Human

<400> 28

ATGTGCTGGC TGCAGGATG GGGCCAGATC CTCCGCCAG TTTCCCTCTC CCTCTTCTC 60  
ATCCAATTGC TTATCAGCTT CTCAGAGAAT GGTTTATCC ACAGCCCCAG GAACAATCAG 120  
AAACCAAGAG ATGGAATGA AGAGGAATGT GCTGAAAGA AGAGTTGTCA ATTGTGCACA 180  
GAAGATAAGA AATATATGAT GAATAGATAA 210

<210> 29

<211> 210

<212> DNA

<213> Human

<400> 29

ATGGGGTTCC CGGCCGCCGC GCTGCTCTGC GCGCTGTGCT GCGGCCTCCT GGCCCCGGCT 60  
GCCCGCGCCG GCTACTCCGA GGAGCGCTGC AGCTGGAGGG GCAGGCCACG CCGCACCCAGG 120  
ACATCAGCCG CGCGTGGCC GCCTTCCGCT TTGAGCTGCG CGAGGACGGG CGCCCCGAGC 180  
TGCCCCCGCA GGCCCACGGT CTCGGCGTAG 210

<210> 30

<211> 594

<212> DNA

<213> Human

<400> 30

ATGCGAGGTG GCAAATGCAA CATGCTCTCC AGTTGGGGT GTCTACTTCT CTGTGGAAGT 60  
ATTACACTAG CCCTGGAAA TGACAGAAA TTGCCAAAAG GTAAAAGGCC AAACCTCAA 120  
GTCCACATCA ATACCACAAG TGACTCCATC CTCTGAAGT TCTTGCCTCC AAGTCCAAAT 180  
GTAAAGCTTG AAGGTCTTCT CCTGGGATAT GGCAGCAATG TATCACCAAA CCAGTACTTC 240

CCTCTTCCCG CTGAAGGGAA ATTACAGAA GCTATAGTTG ATGCAGAGCC GAAATATCTG 300  
ATAGTTGTGC GACCTGCTCC ACCTCCAAGT CAAAAGAAGT CATGTTCAAGG TAAAACTCGT 360  
TCTCGAAAC CTCTGCAGCT GGTGGTTGGC ACTCTGACAC CGAGCTCGGT CTTCCGTGCC 420  
TGGGGTTTCC TCATCAACCC ACACCATGAC TGGACATTGC CAAGTCACTG TCCCAATGAC 480  
AGATTTTATA CAATTGCTA TCGAGAAAAG GATAAAGAAA AGAAGTGGAT TTTTCAAATC 540  
TGTCCAGCCA CTGAAACAAT TGTGGAAAAC CTAAGGCCA ACACAAGTTT ATGA 594  
<210> 31  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 31  
ATGCCAAGT ACCTGGCCCA GATCA 25  
<210> 32  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 32  
TCACGTATGG GGCATCTGCC CTTTT 25  
<210> 33  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>

<400> 33

ATGCACAGAT CAGAGCCATT TCTGA 25

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 34

TTACAGTAGT GGCAGTAACA CTTGG 25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 35

ATGAAGTTCG TCCCCTGCCT CCTGC 25

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 36

TCACCCTCGG AAGAAGCTGA TGAGA 25

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 37

ATGGGACCTG TGC GGTTGGG AATAT 25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 38

TCAAAGATCT TCTCGGTCAA GTTTG 25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 39

ATGTTTGCC CACTGAACT CATCC 25

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 40

TCATGAAAAT ATCCATTCTA CCTTG 25

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 41

ATGGAAC TGC TTCAAGT GAC CATTC 25

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 42

TCAGTTCTTG GTTTTCCTT GTGCA 25

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 43

ATGCGACCCC AGGGCCCCGC CGCCT 25

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 44

TTATTTGGT AGTTCTCAA TAATG 25

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 45

ATGAAGTTAC AGTGTGTTTC CCTTT 25

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 46

TCAGGAGGCC GATGGGGGCC AGCAC 25

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 47

ATGCCAGCC TGGGGCTGCT GCTCC 25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 48

TCATGAGGCT CCTGCAGAGG TCTGA 25

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 49

ATGAAACTCC TGCTGCTGGC TCTTC 25

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 50

TCATGAGCTA TGGTGAACAT TTGGA 25

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 51

ATGGGCGGCC TGCTGCTGGC TGCTT 25

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 52

CTACTGTGAC AGGAAGCCCA GGCTC 25

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 53

ATGGCCCCGGC ATGGGTTACC GCTGC 25

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 54

TTACAGCTCC CCTGGCGGCC GGCCT 25

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 55

ATGTGCTGGC TGCAGGGCATG GGGCC 25

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 56

TTATCTATTTC ATCATATATT TCTTA 25

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 57

ATGGGGTTCC CGGCCGCGGC GCTGC 25

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 58

CTACGCCGAG ACCGTGGGCC TGC GG 25

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 59

ATGCGAGGTG GCAAATGCAA CATGC 25

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 60

TCATAAACTT GTGTTGGGCT TTAGG 25

<210> 61

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 61

TCGGAATTCTG CCATGGCCAA GTACCTGGCC CAGATC 36

<210> 62

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 62

ACGCTCGAGT TACTTGTCTG CGTCGTCCCTT GTAGTCCGTA TGGGGCATCT GCCCTTTTC 60

<210> 63

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 63

TCGGAATTCTG CCATGGCCAG CCTGGGGCTG CTGCTC 36

<210> 64

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 64

ACGCTCGAGT TACTTGTCTG CGTCGTCCCTT GTAGTCTGAG GCTCCTGCAG AGGTCTGAGA 60

<210> 65

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 65

TCGGAATTCA CCATGAAACT CCTGCTGCTG GCTCTT 36

<210> 66

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 66

ACGGCTCGAGT TACTTGTCAT CGTCGTCCCTT GTAGTCTGAG CTATGGTCAA CATTGGAAG 60

<210> 67

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 67

TAGACGAATT CCCACCATGG GACCTGTGCG GTTGGGAATA TTGC 44

<210> 68

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 68

AGGCAAGTCG ACAAGATCTT CTCCGTCAAG TTTGGGGTGG CTTCCGTCT TGGTCAT 57

<210> 69

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 69

GTGTAGAATT CCCACCATGG GCGGCCTGCT GCTGGCTGCT TTTCTGGCTT T 51

<210> 70

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 70

CTGGGCGTCG ACCTGTGACA GGAAGCCCAG GCTCCTGCTC CACT 44

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03221

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C07K14/47, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, G01N33/50  
G01N33/15, G01N33/563, A61K38/16, A61K39/395  
//C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C07K14/00~19/00, C12N15/00~90, C12P21/00~08,  
G01N33/00~98, A61K38/00~48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 00/05367, A2 (SAGAMI CHEMICAL RESERCH CENTER),	1, 2
PY	03 February, 2000 (03.02.00) (Family: none)	3-7
PX	WO, 99/24836, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.),	1-6, 8
PY	20 May, 1999 (20.05.99)	7
	& AU, 9913037, A	
X	JP, 10-70986, A (BML K.K.),	1-3
Y	17 March, 1998 (17.03.98)	4-8
	& US, 5962319, A	
PX	WO, 99/31131, A2 (ZYMOGENETICS, INC.),	1-3
PY	24 June, 1999 (24.06.99)	4-8
	& AU, 9920024, A	
PX	WO, 99/67385, A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.),	1-5
PY	29 December, 1999 (29.12.99)	6-8
	& AU, 9948268, A	
PX	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.),	1-3
PY	09 December, 1999 (09.12.99)	4-8
	& AU, 9943286, A	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 August, 2000 (29.08.00)

Date of mailing of the international search report  
12 September, 2000 (12.09.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03221

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 99/57144, A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 11 November, 1999 (11.11.99) & AU, 9938859, A	1-8
PX PY	US, 5958726, A (Genetics Institute, Inc.), 28 September, 1999 (28.09.99) (Family: none)	1,2 3-8
PX	WO, 00/06698, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 10 February, 2000 (10.02.00) (Family: none)	1-6,8 7
X	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 10 December, 1998 (10.12.98) & AU, 9878120, A	1-6,8 7
X Y	WO, 98/08870, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 05 March, 1998 (05.03.98) & AU, 9671552, A & EP, 963377, A1 & US, 5985614, A	1-3,8 4-7
X Y	WO, 98/39448, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 11 September, 1998 (11.09.98) & AU, 9865453, A & AU, 9891304, A & EP, 972030, A2	1-6,8 7
PX PY	WO, 99/31117, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 24 June, 1999 (24.06.99) & AU, 9923064, A	1-6,8 7
PX PY	WO, 99/46289, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 16 September, 1999 (16.09.99) & AU, 9930067, A	1-6,8 7
X Y	WO, 99/22243, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 06 May, 1999 (06.05.99) & AU, 9912734, A	1-6,8 7
X Y	WO, 98/42738, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 01 October, 1998 (01.10.98) & AU, 9865646, A & EP, 970110, A1	1-6,8 7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP00/03221

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

A group of inventions as set forth in claim 1 are not so linked as to form a single general inventive concept. The reason therefor is as follows. The same also applies to inventions as set forth in claims 2 to 8 wherein claim 1 is cited substantially.

[Reason] Polypeptides containing at least one amino acid sequence selected from among those represented by SEQ ID NOS:1 to 15 are considered as a group of inventions exclusively in the point of being "novel secretory peptides" in the description of the present application. However, the term "secretory" means neither the structure (amino acid sequence) of polypeptides nor major function thereof but merely a characteristic thereof (i.e., being secretory or not). In addition, the 15 polypeptides as described above are not identical with each other in the major parts of their amino acid sequences.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/03221

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K14/47, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, G01N33/50  
 G01N33/15, G01N33/563, A61K38/16, A61K39/395  
 //C12N15/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K14/00~19/00, C12N15/00~90, C12P21/00~08,  
 G01N33/00~98, A61K38/00~48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)  
 SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 00/05367, A2 (SAGAMI CHEMICAL RESERCH CENTER)	1, 2
PY	03.02月.2000 (03.02.00) ファミリーなし	3-7
PX	WO, 99/24836, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	1-6, 8
PY	20.05月.1999 (20.05.99) & AU, 9913037, A	7
X	JP, 10-70986, A (株式会社ビー・エム・エル)	1-3
Y	17.03月.1998 (17.03.98) & US, 5962319, A	4-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 29.08.00	国際調査報告の発送日 12.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8935 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 齋藤 真由美 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 8931

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
PX	WO, 99/31131, A2 (ZYMOGENETICS, INC.)	<u>1 - 3</u>
PY	24.06月.1999 (24.06.99) & AU, 9920024, A	<u>4 - 8</u>
PX	WO, 99/67385, A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.)	<u>1 - 5</u>
PY	29.12月.1999 (29.12.99) & AU, 9948268, A	<u>6 - 8</u>
PX	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.)	<u>1 - 3</u>
PY	09.12月.1999 (09.12.99) & AU, 9943286, A	<u>4 - 8</u>
PX	WO, 99/57144, A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.)	<u>1 - 8</u>
	11.11月.1999 (11.11.99) & AU, 9938859, A	
PX	US, 5958726, A (Genetics Institute, Inc.)	<u>1, 2</u>
PY	28.09月.1999 (28.09.99) ファミリーなし	<u>3 - 8</u>
PX	WO, 00/06698, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	<u>1 - 6, 8</u>
	10.02月.2000 (10.02.00) ファミリーなし	<u>7</u>
X	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	<u>1 - 6, 8</u>
	10.12月.1998 (10.12.98) & AU, 9878120, A	<u>7</u>
X	WO, 98/08870, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	<u>1 - 3, 8</u>
Y	05.03月.1998 (05.03.98) & AU, 9671552, A & EP, 963377, A1 & US, 5985614, A	<u>4 - 7</u>
X	WO, 98/39448, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	<u>1 - 6, 8</u>
Y	11.09月.1998 (11.09.98) & AU, 9865453, A & AU, 9891304, A & EP, 972030, A2	<u>7</u>
PX	WO, 99/31117, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	<u>1 - 6, 8</u>
PY	24.06月.1999 (24.06.99) & AU, 9923064, A	<u>7</u>
PX	WO, 99/46289, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	<u>1 - 6, 8</u>
PY	16.09月.1999 (16.09.99) & AU, 9930067, A	<u>7</u>
X	WO, 99/22243, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	<u>1 - 6, 8</u>
Y	06.05月.1999 (06.05.99) & AU, 9912734, A	<u>7</u>
X	WO, 98/42738, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.)	<u>1 - 6, 8</u>
Y	01.10月.1998 (01.10.98) & AU, 9865646, A & EP, 970110, A1	<u>7</u>

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特許請求の範囲第1項に記載の一群の発明は、以下の理由により、单一の一般的発明概念を形成するように連関していない。なお、特許請求の範囲第2—8項に記載の各発明も、同第1項を実質的に引用していることから同じ理由がある。

【理由】配列番号1ないし配列番号15から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、本願明細書中「新規分泌性ポリペプチド」という点でのみ、一群の発明ととらえられている。しかしながら、「分泌性」というのは、ポリペプチドの一側面として、分泌型か否かと單なる特徴だけであり、ポリペプチドの構造(アミノ酸配列)でも、主要機能でもない。しかも、上記15種類のポリペプチドのアミノ酸配列の主要部分が同一ではなく、作用機能も同一でもない。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。